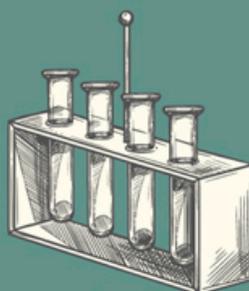
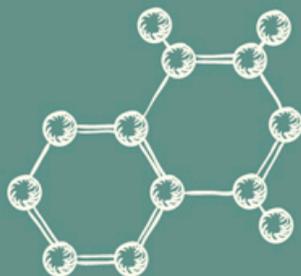
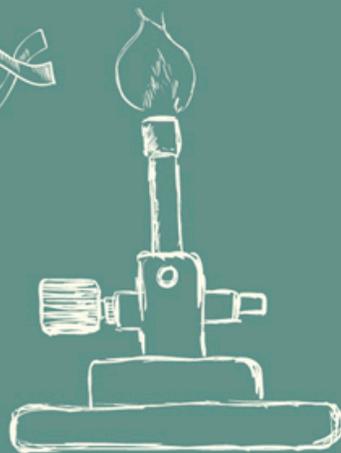


Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022

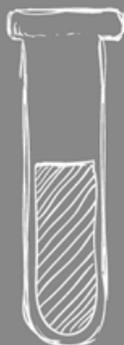
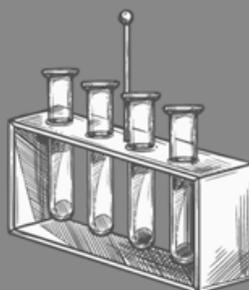
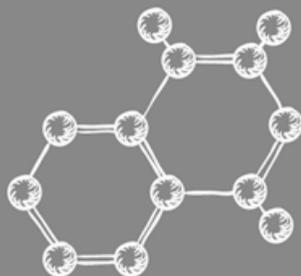
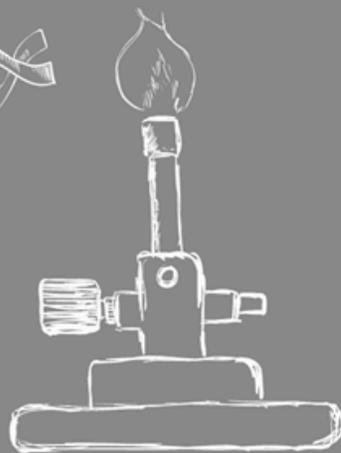


Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- organizadores -

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- organizadores -

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Edição de arte da capa

Vinícius Souza Tarabal

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena

Editora

Direitos para esta edição cedidos à

Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena

Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano

Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras

Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Universidade do Estado de Mato Grosso

Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Edevaldo de Castro Monteiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Prof^ª Dr^ª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof^ª Dr^ª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Prof^ª Dr^ª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Renato Jaqueto Goes – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof^ª Dr^ª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Práticas em bioquímica analítica

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Flávia Roberta Barão
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadores: Paulo Afonso Granjeiro
 Adriano Guimarães Parreira
 Daniel Bonoto Gonçalves
 José Antônio da Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
P912	<p>Práticas em bioquímica analítica / Organizadores Paulo Afonso Granjeiro, Adriano Guimarães Parreira, Daniel Bonoto Gonçalves, et al. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.</p> <p>Outro organizador José Antônio da Silva</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-0709-6 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.096221411</p> <p>1. Bioquímica. I. Granjeiro, Paulo Afonso (Organizador). II. Parreira, Adriano Guimarães (Organizador). III. Gonçalves, Daniel Bonoto (Organizador). IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 572</p>
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná – Brasil
 Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

PREFÁCIO

Medida pelos mais variados parâmetros, é incontestável a expansão das informações científicas produzidas nas últimas décadas. Em particular, a Bioquímica atravessa um período de aumento exponencial de conhecimentos.

Muitos desses conhecimentos têm sido aplicados, com uma velocidade e uma eficiência sem precedentes, na melhoria das condições de vida e bem-estar dos seres humanos. A saúde pública, a produção de alimentos, as matrizes energéticas, o cuidado com o meio ambiente e inúmeros outros setores da vida social têm sido beneficiados pelo contínuo fluxo das informações originadas nos laboratórios de pesquisa.

Para os profissionais envolvidos no ensino de Bioquímica, o crescimento vertiginoso dessa área agravou um crônico paradoxo curricular: o aumento do volume de informações e a manutenção do tempo destinado ao seu ensino.

Uma consequência perceptível desse conflito é a redução das atividades práticas de muitas disciplinas, em franca contradição com o fato de ser a Bioquímica uma ciência experimental. As atividades práticas de laboratório precisam, por isso, ser criteriosamente escolhidas para cumprir seu papel educativo.

A seleção dos experimentos de Bioquímica passa agora a ter um suporte valioso: três docentes da Universidade Federal de São João del Rei e um docente da Universidade Estadual de Minas Gerais, auxiliados por seus estudantes, reuniram, em um *e-book*, **Práticas em Bioquímica Analítica**, um conjunto de experimentos testados, aplicados rotineiramente e minuciosamente descritos.

Cada experimento ou módulo é iniciado com uma introdução teórica, seguida dos objetivos que devem ser alcançados pelos alunos e, naturalmente, pelos materiais e métodos a serem utilizados e o protocolo detalhado da atividade a ser realizada. Quando pertinente, é introduzida uma seção intitulada Curiosidades, com informações contextualizadas sobre o assunto em estudo. Para um aprofundamento no assunto, cada experimento é seguido de uma lista de referências bibliográficas. Estão contempladas as unidades programáticas principais do estudo de Bioquímica, precedidas por um excelente capítulo versando sobre segurança e boas práticas de laboratório.

Naturalmente, a totalidade de experimentos apresentados não poderia ser aplicada nas disciplinas comuns de diferentes habilitações – eles foram padronizados para o curso de Bacharelado em Bioquímica. Entretanto, trata-se de um rico repertório de atividades que poderão ser usadas de forma independente ou servir como modelo para adaptações e ajustes às condições de cada instituição e aos objetivos de cada docente.

Os docentes e alunos de Bioquímica ficam agradecidos à equipe autora das **Práticas em Bioquímica Analítica!**

Bayardo Baptista Torres

Professor Sênior - Departamento de Bioquímica. Laboratório de Ensino de Bioquímica. Universidade de São Paulo - USP

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

BIOSSEGURANÇA

Daniel Bonoto Gonçalves
Adriano Guimarães Parreira
Anderson Fernandes de Melo
Wanderson Duarte Penido
Anna Kelly Moura Silva
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Raquel Valinhas e Valinhas
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214111>

CAPÍTULO 2..... 13

PREPARO DE SOLUÇÕES

Daniel Bonoto Gonçalves
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Adriano Guimarães Parreira
Vinícius Souza Tarabal
Wanderson Duarte Penido
Júlia Antunes Tavares Ribeiro

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214112>

CAPÍTULO 3..... 18

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES

Jose Antonio da Silva
Maria Auxiliadora de Oliveira
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Klédna Constância Portes Reis
Anna Kelly Moura Silva
Júlia Antunes Tavares Ribeiro

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214113>

CAPÍTULO 4..... 25

PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES

José Antonio da Silva
Maria Auxiliadora de Oliveira
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Diego Fernandes Livio
Raquel Valinhas e Valinhas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214114>

CAPÍTULO 5..... 32

DOSAGEM DE PROTEÍNAS – MÉTODO BRADFORD

José Antonio da Silva
Maria Auxiliadora de Oliveira
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Diego Fernandes Livio
Raquel Valinhas e Valinhas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214115>

CAPÍTULO 6..... 37

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

José Antonio da Silva
Tháís Paula Rodrigues Gonçalves
Priscila Amaral Diniz
Anderson Fernandes de Melo
Diego Fernandes Livio
Anna Kelly Moura Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214116>

CAPÍTULO 7..... 45

DOSAGEM DE INIBIDORES DE PROTEASES

José Antonio da Silva
Luísa Ferreira da Cruz
Júlia Antunes Tavares Ribeiro
Diego Fernandes Livio
Tháís Paula Rodrigues Gonçalves
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214117>

CAPÍTULO 8..... 55

ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO

José Antonio da Silva
Júlia Antunes Tavares Ribeiro
Tháís Paula Rodrigues Gonçalves
Vinícius Souza Tarabal
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves Gonçalves
Anderson Fernandes de Melo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214118>

CAPÍTULO 9..... 63

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL

José Antonio da Silva
Luísa Ferreira da Cruz
Tháís Paula Rodrigues Gonçalves

Priscila Amaral Diniz
Anna Kelly Moura Silva
Klédna Constância Portes Reis

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214119>

CAPÍTULO 10..... 73

GRAU DE PURIFICAÇÃO E RENDIMENTO DE PROTEÍNAS

José Antonio da Silva
Paulo Afonso Granjeiro

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141110>

CAPÍTULO 11..... 79

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

Paulo Afonso Granjeiro
Diego Fernandes Livio
Maria Auxiliadora de Oliveira
Adriano Guimarães Parreira
Vinícius Souza Tarabal
Tuânia Natacha Lopes Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141111>

CAPÍTULO 12..... 91

CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS

Paulo Afonso Granjeiro
Diego Fernandes Livio
Maria Auxiliadora de Oliveira
Adriano Guimarães Parreira
Vinícius Souza Tarabal
Tuânia Natacha Lopes Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141112>

CAPÍTULO 13..... 103

PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS

Paulo Afonso Granjeiro
Raquel Valinhas
Heloísa Carneiro Colares
Tuânia Natacha Lopes Silva
Luísa Ferreira da Cruz
Felipe Ferreira Silva
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141113>

CAPÍTULO 14.....	112
CARACTERIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS	
Paulo Afonso Granjeiro	
Heloísa Carneiro Colares	
Raquel Valinhas	
Luísa Ferreira da Cruz	
Felipe Ferreira Silva	
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141114	
CAPÍTULO 15.....	121
EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	
Daniel Bonoto Gonçalves	
Felipe Ferreira Silva	
Priscila Amaral Diniz	
Heloísa Carneiro Colares	
Klédna Constância Portes Reis	
Wanderson Duarte Penido	
Anderson Fernandes de Melo	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141115	
CAPÍTULO 16.....	129
CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	
Daniel Bonoto Gonçalves	
Felipe Ferreira Silva	
Priscila Amaral Diniz	
Heloísa Carneiro Colares	
Klédna Constância Portes Reis	
Wanderson Duarte Penido	
Anderson Fernandes de Melo	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141116	
RESPOSTAS DAS QUESTÕES.....	137
SOBRE OS ORGANIZADORES	147
SOBRE OS AUTORES	149

José Antonio da Silva

Maria Auxiliadora de Oliveira

Nayara Lizandra Leal Cardoso

Diego Fernandes Livio

Raquel Valinhas e Valinhas

AGENTE	TIPO	PROPRIEDADE
Sulfato de amônio	Sal	Fácil solubilidade, estabilidade
Sulfato de sódio	Sal	Fácil solubilidade, estabilidade
Etanol	Solvente	Inflamável, risco de desnaturação
Acetona	Solvente	Inflamável, risco de desnaturação
Polietileno glicol, PEG	Polímero	Não-inflamável, não-explosivo

Quadro 4 - Agentes de precipitação.

Fonte: do próprio autor (2022).

1. INTRODUÇÃO

Precipitação

A precipitação de uma proteína de um extrato pode ser realizada pela adição de sais, solventes ou polímeros orgânicos ou ainda, pela variação do pH ou da temperatura da solução. Os agentes de precipitação, mais comumente utilizados estão relacionados no quadro 4 (SCOPES; 2010; WILSON; WALKER, 2010).

Precipitação Salina

A propriedade particular como agente de precipitação é que eles aumentam o efeito hidrofóbico na solução e promovem a agregação de proteínas pela associação de superfícies hidrofóbicas.

Ânions: PO_4^{-3} , SO_4^{-2} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_3^- , I^- , SCN^-

Cátions: NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Guanidina $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+$

Precipitação Isoelétrica

As proteínas apresentam diferentes pontos isoelétricos devido a seu conteúdo de aminoácidos que possuem diferentes grupos R ionizáveis, podendo ser separadas umas das outras por precipitação isoelétrica. O pH em que a proteína tem sua solubilidade mínima é o seu pH isoelétrico, definido como pH em que a molécula não apresenta carga elétrica efetiva e é incapaz de se deslocar em um campo elétrico (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2001).

Nesse pH a proteína tem suas cargas intra e intermolecularmente, formando assim enormes complexos eletrostáticos, excluindo a água do microambiente e eliminando gradativamente pontes de H dos grupos polares que vão sendo neutralizados, temos diminuídas as forças repulsivas e as proteínas tendem a se agregarem. Ajusta-se o pH da mistura de

proteínas próximo do ponto isoelétrico da proteína a ser precipitada (SILVA *et al.*, 2015a).

Na prática, essa técnica é combinada com *salting-out* para que a proteína seja purificada perto de seu ponto isoelétrico. A precipitação é acelerada pelo *salting-out* pois no pH isoelétrico da proteína ela está menos solúvel.

Os chamados sais aniônicos são os agentes mais eficientes. Eles aumentam o efeito hidrofóbico na solução e promovem a agregação de proteínas pela associação de superfícies hidrofóbicas. Os sais catiônicos diminuem o efeito hidrofóbico e desta maneira, ajudam a preservar as proteínas em solução (PESSOA; KILIKIAN, 2005; WILSON; WALKER, 2010)..

Ajuste de pH: tem sido usado como um passo simples e comum para precipitar proteínas. As proteínas possuem solubilidade baixíssima em seu ponto isoelétrico; este procedimento, às vezes, é usado em fracionamento de soro e também na purificação de insulina. Além do pH, outro parâmetro que influencia na precipitação de proteínas em soluções salinas é a temperatura (SCOPES, 2010).

Precipitação por Solventes Orgânicos

- Solventes orgânicos miscíveis em água (acetona, etanol) são bons precipitantes de proteínas pois diminuem a força de solvatação da solução aquosa (possuem constante dielétrica inferior que da água) - dessa forma diminuem a solubilidade das proteínas - favorecem sua agregação.
- Isto é, as moléculas de água fazem ligações de hidrogênio com o grupo carbonílico do solvente orgânico; isto é, retira água de solvatação diminuindo a solubilidade das proteínas. Pode-se associar *salting-out* com solvente orgânico para aumentar a eficiência na precipitação.
- Dimetil sulfoxido (DMSO) ou *N,N*-dimetilformamida (DMF) são bons solventes de proteínas pois possuem constante dielétrica relativamente alta. Promove a precipitação da proteína adequando o decréscimo de água na solução, sendo a água substituída pelo solvente.
- São largamente utilizados como agentes de precipitação, especialmente no fracionamento de proteínas do soro. Durante o processo, utilizando tal agente, são controladas cinco variáveis: concentração do solvente orgânico, concentração de proteína, pH, força iônica e temperatura.

Liofilização

A liofilização pode ser definida como processo de secagem de uma substância congelada na qual a maior parte de água é removida diretamente por sublimação, sem passar pelo estado líquido. O material é mantido congelado do início ao fim do processo, mantendo os constituintes originais e a forma estrutural inicial. O produto liofilizado tem aparência porosa, podendo ser reconstituído imediatamente à forma original, pela adição

de água. O tempo de vida útil é elevado se comparado a um produto não liofilizado. Como a quantidade de água do material é reduzida, diminui-se a possibilidade de ocorrerem reações de oxidação ou ação enzimática (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

O primeiro produto a ser liofilizado foi o vírus da raiva, em 1911. Durante a Segunda Guerra Mundial a liofilização atingiu o processo industrial devido à elevada necessidade por plasma sanguíneo. Além disso, a tecnologia também avançou com o desenvolvimento dos projetos espaciais, quando se liofilizou alimentos para astronautas da NASA. Muitos produtos atualmente são liofilizados, incluindo desde antibióticos, anticoagulantes, enzimas, hormônios até frações de sangue. Na indústria farmacêutica, a utilização mais direta está relacionada à produção de injetáveis. Em biotecnologia, o uso de microrganismos e proteínas recombinantes e nanopartículas tornaram a liofilização um processo comum. Costuma-se também liofilizar bactérias e vírus para a manutenção de sua viabilidade e uso após longos períodos de armazenamento (PESSOA; KILIKIAN, 2005). Na figura 4 podemos observar o sistema de liofilização.

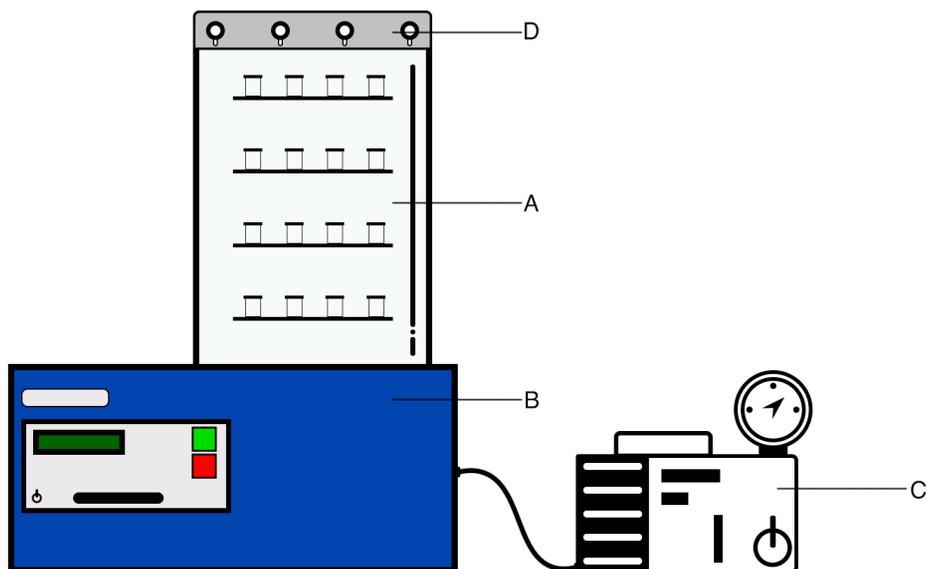


Figura 4 - Sistema de liofilização. (A) uma câmara de secagem, onde é colocado o material, e que deve ser resistente ao vácuo; (B) um condensador; (C) bomba de vácuo; e (D) sistema de vácuo para fechamento dos frascos.

Fonte: do próprio autor (2022).

2 . OBJETIVOS

Precipitar proteínas de sementes de *Amaranthus caldatus*.

3 . MATERIAIS

- a) Pipetas automáticas,
- b) Agitador magnético,
- c) Barra magnética,
- d) Becker de 25 ou 50 mL,

4 . SOLUÇÕES

- a) Solução Salina 0,15 M
- b) Sulfato de amônia

5 . PROCEDIMENTOS

A. Precipitação Sulfato de Amônio

De acordo com a tabela 2 é possível saber a quantidade de sulfato amônio necessário para a precipitação. Nesse experimento a precipitação será de 0-60%.

A seguir as etapas do experimento:

1. Medir o volume de sobrenadante e precipitar com sulfato de amônio na proporção 1L/242 g;
2. Adicionar lentamente o sulfato de amônio e deixar 30min sob agitação;
3. Deixar overnight em refrigeração;
4. Centrifugar e reservar o sobrenadante para a etapa seguinte;
5. Ressuspender em pouco volume de água.

B. Diálise

1. Após recolher o sobrenadante da centrifugação, transferir todo conteúdo para um saco de diálise;
2. Prender as extremidades com grampos para diálise, a fim de se evitar o vazamento do material;
3. Encher um béquer de 2.000 mL com água destilada e acrescentar o saco de diálise dentro do mesmo;

4. Colocar para agitar em velocidade lenta, somente para movimentação da água;
5. Trocar a água do reservatório (béquer) de uma em uma hora até completar 24h;
6. Após esse tempo, retirar a amostra do saco de diálise abrindo uma das extremidades e vertendo todo o conteúdo em um béquer;
7. Identificar e reservar para posterior liofilização.

C. Liofilização

1. Verter todo o conteúdo dialisado em Erlenmeyer, dividindo o volume de 30 mL por Erlenmeyer;
2. Vedar os Erlenmeyer com plástico filme, fazer pequenos furos neste plástico e identificar os Erlenmeyer;
3. Congelar o extrato em nitrogênio líquido até que eles fiquem “queimando”;
4. Levar para liofilização, seguindo o POP (Procedimento Operacional Padrão) para utilização do equipamento que deve estar anexado ao lado do próprio equipamento;
5. Aguardar 48h e retirar o material;
6. Guardá-los devidamente identificados.

6 . QUESTÕES

1. Explique o efeito salting out e como ele interfere na solubilidade de proteínas?
2. Sobre o método de purificação de proteínas por precipitação isoelétrica, quais características das proteínas permitem que este processo seja realizado?
3. Porque solventes orgânicos polares (miscíveis em água) são mais indicados para o processo de precipitação de proteínas?
4. Explique o processo de Liofilização.

7 . CURIOSIDADES

Os avanços em biotecnologia representam potencial para a indústria de alimentos no desenvolvimento de novos produtos e processos. Esse desenvolvimento incluiria a purificação de biomoléculas, tais como enzimas e proteínas, a partir de meios complexos como os de fermentação ou de efluentes industriais.

Assim, torna-se necessário o conhecimento das técnicas empregadas no processo de purificação de biomoléculas, sobretudo as técnicas cromatográficas. No entanto, deve-se considerar que ainda existem restrições técnicas e econômicas na aplicação de algumas dessas técnicas, principalmente em escala preparativa. Tais restrições não têm impedido que muitos laboratórios utilizem a cromatografia para a produção de substâncias com

atividade biológica, de custo elevado no mercado, o que justificaria o emprego das técnicas cromatográficas na produção de alguns miligramas de substâncias com atividade biológica. Para que a purificação de biomoléculas de baixo valor comercial, em grande escala, possa ser economicamente viável novos desenvolvimentos na engenharia de processo e nas técnicas de separação devem ser realizados.

Starting percent saturation	Final percent saturation to be obtained																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

Tabela 2 - Tabela para ensaio de precipitação por sulfato de amônio.

Fonte: Adaptado de Scopes (2010).

REFERÊNCIAS

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B., Purificação de Produtos Biotecnológicos. 1ª Edição, Editora Manole, Barueri-SP. 2005.

SCOPES, R. K. Protein Purification: principles and practices. Editora Springer Nature. 3a Edição. 2010.

SILVA, J. A.; DAMICO, D. C. S.; BALDASSO, P. A.; MATTIOLI, M. A.; WINCK, F. V.; FRACETO, L. F.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Isolation and biochemical characterization of galactoside binding lectin *Bauhinia variegata* candida (BvCL) Seeds. The Protein Journal, v. 26, n. 3, p. 193-201, 2007

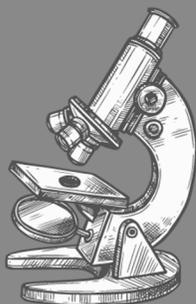
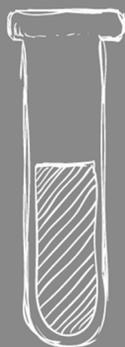
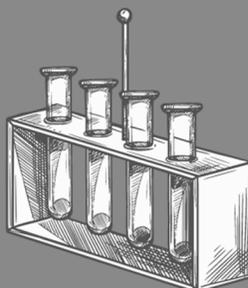
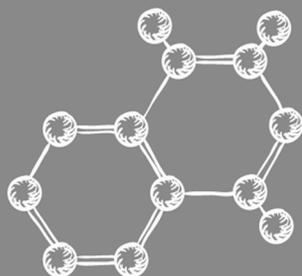
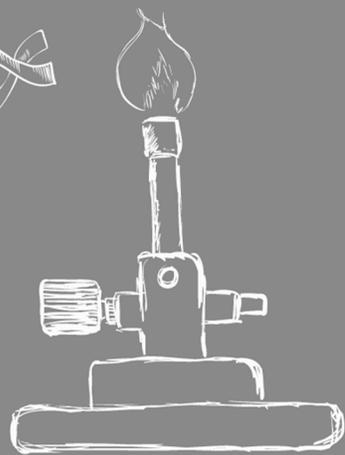
SILVA, J. A.; MACEDO, M. L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. Journal of Protein Chemistry, v. 20, n.1, p.1-7, 2001.

SILVA, J. A.; POMPEU, D. G; COSTA, O. F.; GONÇALVES, D. B; SPEHAR, C. R; MARANGONI, S.; GRANJEIRO, P.A. The importance of heat against antinutritional factors from *Chenopodium quinoa* seeds. Food Science Technology, v. 35, n. 1, p. 74- 82, 2015a.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry and Molecular Biology. 7ª Edição, 802 p. Cambridge University press, Cambridge - Grã Bretanha, 2010.

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

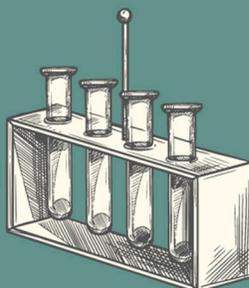
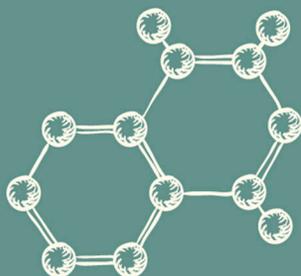
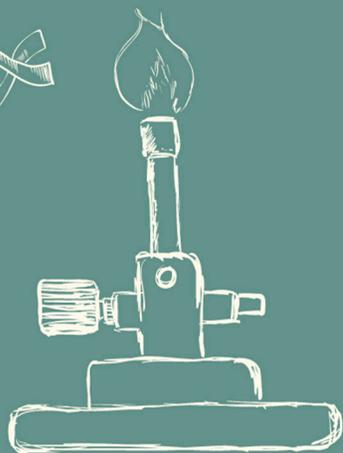
contato@atenaeditora.com.br 

@atenaeditora 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

@atenaeditora 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 